

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-308582

(43) 公開日 平成8年(1996)11月26日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
// C 0 7 K 14/47		8517-4H	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/21		8828-4B	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-123757	(71) 出願人	000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
(22) 出願日	平成7年(1995)5月23日	(72) 発明者	瀧澤 稔 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会 社研究所内
		(72) 発明者	松尾 登 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会 社研究所内
		(74) 代理人	弁理士 有賀 三幸 (外3名)

(54) 【発明の名称】 ラットGM2アクチベータ蛋白質遺伝子

(57) 【要約】

【構成】 ラットGM2アクチベータ蛋白質をコードする遺伝子。

【効果】 この遺伝子を用いればラットGM2アクチベータ蛋白質を大量生産することができ、また、ラットは実験動物として利用し易いことから、糖脂質代謝異常疾患の診断や研究に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラットGM2アクチベータ蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項2】 配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするものである請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 配列番号2に記載の塩基配列を有するものである請求項1記載の遺伝子。

【請求項4】 配列番号3に記載の塩基配列を有するものである請求項1記載の遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は実験動物として有用なラットの糖脂質代謝機能及び糖脂質代謝異常性疾患の診断や研究に使用できるラットのGM2アクチベータ蛋白質遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】 糖脂質は生体膜、特に赤血球膜や神経ミエリンに多く存在し、特に神経ミエリンでは極めて重要な役割を果たしているといわれている。この糖脂質の代謝には、種々の加水分解酵素が関与しており、その加水分解酵素の欠損は糖脂質代謝異常を生起し、しばしば重篤な神経症状を呈する疾患の原因となることが知られている。

【0003】 ところで、近年、この糖脂質の代謝には加水分解酵素だけでなく、アクチベータ蛋白質が深く関与していることが明らかになっている。例えば、ガングリオシドGM2の代謝には、 β -ヘキソサミニダーゼAとGM2アクチベータ蛋白質の両者が必要である。この β -ヘキソサミニダーゼA及びGM2アクチベータ蛋白質によるGM2の代謝異常に起因する疾患としては、Tay-Sachs病、Sandhoff病及び若年性GM2ガングリオシドーシスAB型などが知られている。

【0004】 このGM2アクチベータ蛋白質の大量生産や生合成の調節にはその遺伝子を解明することが必要であり、すでにヒト及びマウスのGM2アクチベータ蛋白質遺伝子の全配列が報告されている[Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 177, No. 3, 1217-1223 (1991), Biochem. J., 294, 227-230 (1993)]。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、糖脂質代謝異常を研究するにあたってマウスは、採血できる量が少ない、採取できる臓器量が少ない、外科手術が困難である、糖脂質代謝研究のバックグラウンドが少ない等の理由により実験動物として使用するには限界があり、実験動物として取扱い易い動物のGM2アクチベータ蛋白質遺伝子の解明が望まれていた。従って、本発明の目的は実験動物として好ましい動物のGM2アクチベータ蛋白質の遺伝子を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 そこで本発明者らは、実験動物として有用なラットに着目し、そのGM2アクチベータ蛋白質遺伝子の解明について研究した結果、当該遺伝子のクローニングに成功し、本発明を完成するに至った。

【0007】 すなわち、本発明はラットGM2アクチベータ蛋白質をコードする遺伝子を提供するものである。

【0008】 以下、本発明を具体的に説明する。本発明10 遺伝子のクローニングは、ラット表皮細胞から抽出したRNAを用いて作製したcDNAライブラリーから特定のDNAをプローブとして用いて目的遺伝子をスクリーニングすることにより行なわれる。

【0009】 まず、cDNAライブラリーの調製は、ラット表皮細胞から全RNAを抽出し、次いでそのRNAにpolyAを付加した後、常法、例えばGubler & Hoffmanの変法[Gene 25, 263-269 (1983)]に従って、mRNAから逆転写酵素を用いて行なうことができる。

20 【0010】 次に、用いられる特定のプローブDNAについて説明する。このプローブとしては、目的とするラットGM2アクチベータ蛋白質遺伝子と相同性の高いヒト又はマウスのGM2アクチベータ蛋白質遺伝子、あるいは当該遺伝子の一部の塩基配列を有する合成プローブを用いることもできるが、本発明においてはセラミド：ガラクトース転移酵素遺伝子をプローブとして用いることが好ましい。

30 【0011】 近年、今まで遺伝子の報告された蛋白質とはタイプの異なる酵素であるセラミド：ガラクトース転移酵素セラミド：ガラクトース転移酵素のcDNAがクローニングされた[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10265-10269, 1993]。この酵素は疎水性の強い膜酵素であり、この酵素の遺伝子をプローブにして、cDNAライブラリーのスクリーニングを行なえば疎水性の強い新たなスフィンゴ糖脂質の代謝に関与する酵素、蛋白質の遺伝子がクローニングできる可能性が高いと考えた。そこでラット脳のRNAからRT-PCR法によりセラミド：ガラクトース転移酵素遺伝子をクローニングし、それをプローブとして40 用い、セラミド：ガラクトース転移酵素を発現していないラット表皮cDNAライブラリーのスクリーニングを行なった。

【0012】 20万クローンをスクリーニングし、6つのポジティブクローンが得られた。各クローンの一部の塩基配列を調べ、既知の遺伝子であるか調べた。その結果、2つのクローンはマウス(Biochem. J. 294, 227-230, 1993)、ヒト(Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 1217-1223, 1991)のガングリオシド50 GM2アクチベータ蛋白質の遺伝子とホモロジーが高か

3

ったので、インサート長の大きかったほうのクローンの全長のシーケンスを調べたところ、全長は1983bpで、塩基配列から推定されるオープンリーディングフレームは、12~608番目の塩基の199アミノ酸であった。オープンリーディングフレームをマウス、ヒトのcDNAと比較すると塩基配列ではマウスと86.9%、ヒトと71.4%、アミノ酸配列ではマウスと84.42%、ヒトと65.32%のホモロジーがあり、このクローンはラットのGM2アクチベータ蛋白質のcDNAであることが判明した。

【0013】このようにして得られる本発明ラットGM2アクチベータ蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号2に、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号1に、また得られた遺伝子の全塩基配列及び推定アミノ酸配列を配列番号3に示す。

【0014】本発明の遺伝子を用いれば、遺伝子を組み込んだベクターを大腸菌に導入する(Biochem. J., 292, 571-576 (1993))、動物細胞に導入する(Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 177, No. 3, 1217-1223 (1991))、酵母に導入する(Bio/Technology, 9, 1382-1385 (1991))、昆虫細胞に導入する(Agic. Biol. Chem., Vol. 51, No. 6, 1573-1580 (1987))等の常法の遺伝子組換え技術によりラットGM2アクチベータ蛋白質を大量に生産することができる。

【0015】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに何ら限定されるものではない。

【0016】実施例1

(1) オリゴヌクレオチドの合成

PCRプライマーに用いるUDP-ガラクトース：セラミドガラクトース転移酵素(以下セラミド：ガラクトース転移酵素)遺伝子増幅用のオリゴヌクレオチド(GTACTGACGTAGCACTGGAGTTTC, TCAATGACCGACACATATCTGCTC)は、ファルマシア社DNA合成システムGene Assembler Specialを用いて0.2μmoleのスケールでFinal detritylationしないで合成し、アプライドバイオシステム社のオリゴヌクレオチド精製カートリッジを用いて精製した。

(2) 新生ラット脳のRNA抽出

生後6日目のWistar系ラットから脳を摘出し、PBSで洗浄した後、ISOGEN、(株)ニッポンジーン)中で破碎した。クロロホルムを加えて、水層を分離し水層中のRNAをイソプロパノールで沈澱させた。沈澱を75%エタノールで洗浄しRNAを得た。

(3) RT-PCRによるセラミド：ガラクトース転移酵素遺伝子の増幅

4

合成したプライマーDNA、新生ラット脳RNAから、宝酒造(株)GeneAmp RNA PCR Kitを用いてRT-PCRを行ないセラミド：ガラクトース転移酵素遺伝子の増幅を行なった。

(4) DNAの電気泳動

DNAの電気泳動は0.8%アガロースゲル中で40mM Tris-acetate、1mM EDTAを用いて行なった。DNAの検出はエチジウムブロマイドを用いて行なった。

10 (5) PCR産物のプラスミドベクターへのクローニング

PCR産物はインビトロゲン社のTA Cloning kitを用いて、プラスミドベクターpCRIIに組み込み、大腸菌INVαF'を形質転換した。ベクターの入った大腸菌は、アンピシリン、X-galの入った培地で培養し、青/白で選択した。

(6) プラスミドDNAの調製

大腸菌からのプラスミドDNAの抽出は、アルカリ法で行ない、ポリエチレングリコール沈澱により精製した。または、キアーゲン社のプラスミド抽出キットを用いて行なった。

(7) インサートDNAの調製

プラスミドベクターからのインサートの切り出しは、EcoRIにより行ない、アガロース電気泳動によりインサートを分離し、BIO 101社のGENECLEAN IIを用いてアガロースゲルからDNAを回収した。

【0017】(8) 新生ラット表皮のRNA抽出

生後2日目のWistar系ラットより皮膚を採取し、脂肪組織を除いた後、10000PUのディスペーゼを含むPBS(+)に浸し、室温で2時間反応し、表皮を剥離した。この表皮(生重量1g)に10mlのISOGENを加えて振盪し細胞を破碎した。クロロホルムを加えて、水層を分離し水層中のRNAをイソプロパノールで沈澱させた。沈澱を75%エタノールで洗浄しRNAを得た。得られたRNAにISOGENを加え同様の操作によりRNAを抽出し精製した。

(9) polyA+RNAの調製

RNAからpolyA+RNAの調製はオリゴdTセルロースカラムを用いて行なった。

40 (10) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーの作製は、Gubler & Hoffmanの変法(Gene 25, 263-269, 1983)に従って行なった。cDNAの合成はオリゴdTプライマーを用いて行ない、得られたcDNAのサイズセクションを行ない400bp以下のcDNAを除いた。cDNAにBstXIアダプター(5'CTTTCAGCACAGAAAGTC3')を付加しCDM8ベクターのBstXI部位に連結した。得られたcDNAライブラリーで大腸菌MC1061/P3の形質転換を行なった。

50

5

【0018】 (11) マルチプライムラベリング
アマシャムのマルチプライムDNA標識システムまたは、レディプライムDNA標識システムを用いて、セラミド：ガラクトース転移酵素遺伝子断片を $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP ($\sim 110\text{TBq}/\text{mmol}$) で標識した。反応後、D-25スピンカラム (コダック) を用いて未反応の基質を除いた。

【0019】 (12) cDNAライブラリーのスクリーニング

アンピシリン $50\text{mg}/\text{l}$ 、テトラサイクリン $10\text{mg}/\text{l}$ 10
含むLB寒天培地上にナイロンメンブレン (Hybond-N⁺、アマシャム) を置き、その上にラット表皮cDNAライブラリーで形質転換した大腸菌をまき 37°C で一晩培養した。大腸菌の生えたメンブレンを培地で湿らせたナイロンメンブレンと重ね合わせて菌を移し、そのメンブレンをLB寒天培地上で 37°C で5時間培養しレプリカを作製した。菌の生えたナイロンメンブレンを 0.5N NaOH 水溶液に2分間2回浸し溶菌し、 1M Tris-HCl ($\text{pH}7.5$) 水溶液に2分間2回浸し中和後、 80°C で2時間乾燥し、菌のDNAをナイ 20
ロンメンブレンに結合させた。ナイロンメンブレンを $1\times\text{SSC}$ 中で洗浄後、ハイブリダイゼーション溶液 ($6\times\text{SSC}$ 、 $10\times$ デンハルト、 1% SDS、サケ精子DNA $0.125\text{mg}/\text{ml}$) 中で 62°C 、5時間反応した。マルチプライム法で標識したDNAを含むハイブリダイゼーション溶液に交換し、 62°C で一昼夜反応し、洗浄溶液 ($0.1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS) 中、 25°C で20分間振盪し、 45°C で20分間3回振盪した。洗浄後ナイロンメンブレンを乾燥し、放射標識されたコロニーを富士写真フィルム製のバイオ・イメージングアナライ 30
ザーBAS2000を用いて検出した。

(13) DNAシーケンス

アプライドバイオシステム社のTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencingキットを用いてプラスミドDNAを蛍光標識

配列

Met	Arg	Arg	Val	Pro	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Val	Leu
					5				10				15		
Gly	Leu	Leu	Phe	Ala	Gly	Pro	Val	Ala	Pro	Ser	Arg	Leu	Ile	Ser	Lys
					20				25				30		
Arg	Pro	Ser	Gln	Leu	Gly	Gly	Phe	Ser	Trp	Asp	Asn	Cys	Asp	Glu	Gly
					35				40				45		
Lys	Asp	Pro	Ala	Val	Ile	Lys	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Asp	Pro	Ile
					50				55				60		
Val	Val	Pro	Gly	Asp	Val	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Gly	Lys	Thr	Ser	Ile
					65				70				75		80
Pro	Leu	Thr	Ser	Pro	Gln	Lys	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Glu	Lys	Glu	Val
					85				90				95		
Ala	Gly	Phe	Trp	Val	Lys	Ile	Pro	Cys	Val	Glu	Gln	Leu	Gly	Ser	Cys
					100				105				110		

6

し、Model 373A DNAシーケンサーを用いてシーケンシングを行なった。反応に用いるプライマーはベクターの塩基配列及びシーケンシングの結果得られた塩基配列をもとに設計し、日本遺伝子研究所より購入した。

【0020】 (14) 20万クローンをスクリーニングし、6つのポジティブクローンが得られた。各クローンの一部の塩基配列を調べ、既知の遺伝子であるか調べた。その結果、クローン4、5はマウス (Biochem. J. 294, 227-230, 1993)、ヒト (Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 1217-1223, 1991) のガングリオシドGM2アクチベータ蛋白質の遺伝子とホモロジーが高かったので、インサート長の大きかったクローン4の全長のシーケンスを調べたところ、全長は1983bpで、塩基配列から推定されるオープンリーディングフレームは、12~608番目の塩基の199アミノ酸であった。オープンリーディングフレームをマウス、ヒトのcDNAと比較すると塩基配列ではマウスと86.9%、ヒトと71.4%、アミノ酸配列ではマウスと84.42%、ヒトと65.32%のホモロジーがあり、クローン4はラットのGM2アクチベータ蛋白質のcDNAであることが判明した。

【0021】

【発明の効果】本発明の遺伝子を用いればラットGM2アクチベータ蛋白質を大量生産することができ、また、ラットは実験動物として利用し易いことから、糖脂質代謝異常疾患の診断や研究に有用である。

【0022】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：199

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

7 8

Thr Tyr Glu Asn Val Cys Asp Leu Ile Asp Gln Tyr Ile Pro Pro Gly
115 120 125

Glu Thr Cys Pro Glu Pro Leu His Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys
130 135 140

Pro Phe Lys Glu Gly Thr Tyr Ser Leu Pro Ser Ser Asn Phe Thr Val
145 150 155 160

Pro Asp Leu Glu Leu Pro Ser Trp Leu Ser Thr Gly Asn Tyr Arg Ile
165 170 175

Gln Ser Ile Leu Ser Ser Gly Gly Lys Arg Leu Ala Cys Ile Lys Ile
180 185 190

Ala Ala Ser Leu Lys Gly Lys
195

【0023】配列番号：2

配列の長さ：597

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：mRNAに対するcDNA

起源

* 生物名：ラット

配列

ATGCGTCGTG TACCGCTGCT GCTCGTGCTG GGCTTGCTGT TCGTGCTGGG CTGCTGTTC 60

GCTGGCCCTG TCGCCCTTC GCGCCTCATC TCGAAGCGCC CTTCCTCACT TGGTGGCTTC 120

TCCTGGGATA ACTGTGATGA AGGAAAGGAC CTTGCAGTGA TCAAAGCCT CACGCTCCAA 180

CCTGACCCCA TTGTCTGTTC TGGAGATGTG ATCGTCAGTG CTGAGGGCAA GACCAGCATT 240

CCCCTCACTT CTCCTCAGAA GGTGGAGCTC ACCGTGGAGA AGGAAGTGGC TGGCTTCTGG 300

GTCAAGATCC CTGCGTAGA ACAGCTAGGA AGCTGTACCT ATGAGAATGT CTGTGACCTG 360

ATAGACCAAT ACATCCCCC TGGAGAGACC TGCCAGAGC CGCTGCACAC CTACGGGCTG 420

CCCTGCCATT GTCCCTTCAA GGAAGGCACC TACTCACTGC CTTGAGCAA CTTACAGTG 480

CCTGATCTGG AGCTTCCAAG CTGGCTAAGC ACGGGCAACT ACCGCATCCA GAGCATCTTG 540

AGCAGCGGTG GAAAGCGCCT GGCCTGCATC AAGATTGCCG CCTCTCTCAA GGGCAA 597

【0024】配列番号：3

配列の長さ：1983

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：mRNAに対するcDNA

30 起源

生物名：ラット

GGACCGTCGCC ATG CGT CGT GTA CCG CTG CTG CTC GTG CTG GGC TTG CTG 50

Met Arg Arg Val Pro Leu Leu Leu Val Leu Gly Leu Leu 10

TTC GTG CTG GGC TTG CTG TTC GCT GGC CCT GTC GCC CCT TCG CGC CTC 98

Phe Val Leu Gly Leu Leu Phe Ala Gly Pro Val Ala Pro Ser Arg Leu 25

ATC TCG AAG CGC CCT TCC CAA CTT GGT GGC TTC TCC TGG GAT AAC TGT 146

Ile Ser Lys Arg Pro Ser Gln Leu Gly Gly Phe Ser Trp Asp Asn Cys 45

GAT GAA GGA AAG GAC CCT GCA GTG ATC AAA AGC CTC ACG CTC CAA CCT 194

Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Lys Ser Leu Thr Leu Gln Pro 60

GAC CCC ATT GTC GTT CCT GGA GAT GTG ATC GTC AGT GCT GAG GGC AAG 242

Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asp Val Ile Val Ser Ala Glu Gly Lys 75

ACC AGC ATT CCC CTC ACT TCT CCT CAG AAG GTG GAG CTC ACC GTG GAG 290

Thr Ser Ile Pro Leu Thr Ser Pro Gln Lys Val Glu Leu Thr Val Glu 90

AAG GAA GTG GCT GGC TTC TGG GTC AAG ATC CCT TGC GTA GAA CAG CTA 338

9	10
Lys Glu Val Ala Gly Phe Trp Val Lys Ile Pro Cys Val Glu Gln Leu	
95 100 105	
GGA AGC TGT ACC TAT GAG AAT GTC TGT GAC CTG ATA GAC CAA TAC ATC	386
Gly Ser Cys Thr Tyr Glu Asn Val Cys Asp Leu Ile Asp Gln Tyr Ile	
110 115 120 125	
CCC CCT GGA GAG ACC TGC CCA GAG CCG CTG CAC ACC TAC GGG CTG CCC	432
Pro Pro Gly Glu Thr Cys Pro Glu Pro Leu His Thr Tyr Gly Leu Pro	
130 135 140	
TGC CAT TGT CCC TTC AAG GAA GGC ACC TAC TCA CTG CCT TCG AGC AAC	482
Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr Tyr Ser Leu Pro Ser Ser Asn	
145 150 155	
TTC ACA GTG CCT GAT CTG GAG CTT CCA AGC TGG CTA AGC ACG GGC AAC	530
Phe Thr Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro Ser Trp Leu Ser Thr Gly Asn	
160 165 170	
TAC CGC ATC CAG AGC ATC TTG AGC AGC GGT GGA AAG CGC CTG GCC TGC	578
Tyr Arg Ile Gln Ser Ile Leu Ser Ser Gly Gly Lys Arg Leu Ala Cys	
175 180 185	
ATC AAG ATT GCC GCC TCT CTC AAG GGC AAA TAACCAGGCA GCAGCCACCA	628
Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly Lys	
190 195	
TAGAATGAAA GGGCACCAGG AAGGCATGCT TCTTCTTCTG TGTTCGGGG CCCAGAGCTG	688
CCTGCCTCTA ACTCCGTTCT ATGGTTCTCT ACCCTTTCTG CAAATCACGA CAACCTGACC	748
TGAGGGAGGA TGGACCAGGC GGGTCTCGAC ATCTGTTGGG CTGTACGCCA TGCTCCTCG	808
CACCCCTACC AACTTTCTAA GAGTTTCTCT CATGTCCCAA ACAGTCAAGG AATGGGAACC	868
AACATGTTAT GGAATCTTAA GTTCAAGCTG GCCCAACATG GGCCTCTGA AGCTATGCTC	928
ACCCACCTC TTCGTTTATG CCACCAACTT AAAAACAAG ATGACAGTAT TAATCTCTCA	988
TTCCACCCTA AACCTCTCAT CCAGCAAAGA GGTCTAGGTA GCCAGTCTTA GGTCTGCCCC	1048
CCTATTAAT TCCATGATTA ACTACATTCC CTTTGCAACT TGCCTAGCCA AACTGGGGC	1108
TGACAGATCC TGAAAGGGCA GGATGGCGTG TGACAGAAAC CCTGGGAGAG TTATTGTTGG	1168
GCATGCCCCA TTAACCTCAG TAAAGCACAG GTGCCCAGG CCAAGCAGAT CGAGGGAGCC	1228
AAAGCAGTCA CTCCAGGAG CGATGCCAC TTTTCTTCCT TTGGTATGAC GCATACAGAA	1288
TGGGATGACA TTCCTTATAC CTGACAAGAA ACAAACCTGA AACCCCAACA GCACATGTGC	1348
TCCAGTGCCA GGAGGCCAGG GTCTGGAATG GCATGTCTAG TCCTGGAGGT ACAGTCCAGT	1408
GACCTGTAAG TGCCATGTAA GGAATGTTAC CGGATATTG CAACAGTTT CTTCCTTAGG	1468
CCCCAAACCC CAGACTTTTC TATGAAGTCT TAGATTTTT AACTATTAGA AACAAATTGT	1528
TTTTTATATA CTGTTAGGC CAAAGGGGCC ACGTGGACTT GTCTGGGGG TGGGGGGGA	1588
CATAGCTGGC TCACAGGTGG CTGCTTTTT TCTCACACCT GTTCGTCTTC TCAGTCTCAA	1648
GTTATCTGAC TTCATTCTC TCCCCCTCAA GGTCAAGTCC TTGGTACCAG ACCTCAGAGA	1708
GGGCTCAGCC TGCACTGGAG CAGGTCTGCA TGGCCTCTGA GAGCTGGGC CTGTGCCAGC	1768
CTCAGAGCCC CATCACCATC AGGTATAGG GGTTCACACT GGAGTGGATC TCCCCACCC	1828
CACCCCCAG CAGCCACCTT GTGGAACAGG GGTCCCATGT AGAGAGTGGG TCCCACACCG	1888
GGTTGTACCA TGACAACCTC CTGAGCCTCC GTCAGCCCG TTCTGGACTG CAAGACTAGT	1948
CTGTCAATAA ATCTTCTTAA AAAAAAAAA AAAAA	1983

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(7)

特開平8-308582

(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:19)

